

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/51791, A1 (Shunichi Shiozawa), 19 November, 1998 (19.11.98) & AU, 9867486, A	1-6, 8
A	Dina Ron et al. "Molecular cloning and characterization of the human db1 proto-oncogene: evidence that its over expression is sufficient to transform NIH/3T3 cells" The EMBO Journal (1988) Vol.7 No.8 P.2465-2473	1-6, 8
A	Shunichi Shiozawa et al. "Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis" (1998) International Immunology, Vol.10 No.12 P.1891-1895	1-6, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 June, 2000 (29.06.00)

Date of mailing of the international search report
11 July, 2000 (11.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

371P
International application No.

PCT/JP00/01697

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 7 relates to a method for diagnosis of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01697

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/51791, A1 (塩澤 俊一) 19.11月.1998 (19.11.98) & AU, 9867486, A	1-6, 8
A	Dina Ron et al. "Molecular cloning and characterization of the human <i>dbl</i> proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells" The EMBO Journal (1988) Vol. 7 No. 8 P. 2465-2473	1-6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shunichi Shiozawa et al. "Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis" (1998) International Immunology Vol.10 No.12 P.1891-1895	1 - 6, 8

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 _____ 7 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の診断方法に係わるものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

配 列 表

<110> 塩澤俊一

<120> 慢性関節リウマチの疾患遺伝子と慢性関節リウマチの診断方法

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 274

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> CDS

<222> (2).. (271)

<308> GenBank Accession No. X12556

<400> 1

```

t ctt cag cag aat gat gaa aag caa cag gga gct ttt ata agt act gag 49
Leu Gln Gln Asn Asp Glu Lys Gln Gln Gly Ala Phe Ile Ser Thr Glu
      1              5              10              15
gaa act gaa ttg gaa cac acc agc act gtg gtg gag gtc tgt gag gca 97
Glu Thr Glu Leu Glu His Thr Ser Thr Val Val Glu Val Cys Glu Ala
      20              25              30
att gcg tca gtt cag gca gaa gca aat aca gtt tgg act gag gca tca 145
Ile Ala Ser Val Gln Ala Glu Ala Asn Thr Val Trp Thr Glu Ala Ser
      35              40              45
caa tot gta gaa atc tot gaa gaa cct gcg gaa tgg tca agc aac tat 193
Gln Ser Val Glu Ile Ser Glu Glu Pro Ala Glu Trp Ser Ser Asn Tyr
      50              55              60
ttc tac ccc act tat gat gaa aat gaa gaa gaa aat agg ccc ctc atg 241
Phe Tyr Pro Thr Tyr Asp Glu Asn Glu Glu Glu Asn Arg Pro Leu Met
      65              70              75              80
aga cct gtg tcg gag atg gct ctc cta tat tga 274
Arg Pro Val Ser Glu Met Ala Leu Leu Tyr
      85              90

```

<210> 2

<211> 61

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> CDS

<222> (1)..(60)

<400> 2

a gac ctg tgt cgg aga tgg ctc tcc tat att gat gaa gct act atg tca 49

Asp Leu Cys Arg Arg Trp Leu Ser Tyr Ile Asp Glu Ala Thr Met Ser

1

5

10

15

aat ggc aag tag

61

Asn Gly Lys

19

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgaagacct

10

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 4

ggctagattc aaaccaatg

19

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 5

gctacttgcc atttgac

17

E P

US

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
〔PCT 18 条、PCT 規則 43、44〕

出願人又は代理人 00- の書類記号 F-007PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記 5 を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/01697	国際出願日 (日.月.年) 21.03.00	優先日 (日.月.年) 20.03.99	
出願人 (氏名又は名称) 塩澤 俊一			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (P C T 1 7 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の診断方法に係わるものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/12, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/51791, A1 (塩澤 俊一) 19.11月.1998 (19.11.98) & AU, 9867486, A	1-6, 8
A	Dina Ron et al. "Molecular cloning and characterization of the human <i>dbl</i> proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells" The EMBO Journal (1988) Vol.7 No.8 P.2465-2473	1-6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shunichi Shiozawa et al. "Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis" (1998) International Immunology Vol.10 No.12 P.1891-1895	1-6, 8

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO98/51791 (43) 国際公開日 1998年11月19日(19.11.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01665</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月10日(10.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/125899 1997年5月15日(15.05.97) JP 特願平10/31840 1998年2月13日(13.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人; および (72) 発明者 塩澤俊一(SHIOZAWA, Shunichi)[JP/JP] 〒651-2274 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENE CAUSATIVE OF RHEUMATOID ARTHRITIS, METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS, AND METHOD FOR THE DETERMINATION OF FACTORS CAUSING RHEUMATOID ARTHRITIS</p> <p>(54)発明の名称 慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法</p> <p>(57) Abstract A method for the diagnosis of rheumatoid arthritis characterized by amplifying the PCR genomic DNA of a subject with the use of a gene causative of rheumatoid arthritis and located no more than ± 1 centimorgan apart from a DNA sequence hybridizable with microsatellite markers D1S214, D1S253, D8S556, DXS1001, DXS1047, DXS1205, DXS1227 and/or DXS1232 and at least one of the above microsatellite markers as primers, and comparing the resultant PCR products with the corresponding PCR products of a normal subject.</p> <div data-bbox="1071 1302 1412 1827"><p>Maximal Lod Score (MLS)</p><p>Genetic distance (centi Morgan)</p></div>		

(57)要約

この出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、上記マイクロサテライトマーカーの少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	CN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明細書

慢性関節リウマチの疾患遺伝子、慢性関節リウマチの診断方法 および慢性関節リウマチの原因因子の決定方法

技術分野

この出願の発明は、慢性関節リウマチの疾患遺伝子、並びにこれらの遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法に関するものである。

背景技術

慢性関節リウマチの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、この慢性関節リウマチの属する自己免疫疾患の多くは多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・増悪するため、疾患の正しい解明と適切な治療を行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。

慢性関節リウマチは、世界的には罹患率1%以下の疾患であるが(N.Engl.J. Med. 322:1277-1289, 1990)、患者の同胞では約8%以上が発症する(Cell, 85:311-318, 1996)ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。しかしながら、疾患の遺伝的因子を特定するため通常用いられている分子遺伝学的手法や遺伝子工学的手法は、自己免疫疾患に対しては有効に機能していない。何故ならば、自己免疫疾患は、癌のように突然変異を生じた1個の遺伝子の異常増殖という生物学的に単純な機構によって発症するものではないからである。また、疾患の遺伝的基盤を求める従来の古典的遺伝学的手法は、自己免疫疾患が多因子遺伝によることを明確にしたものの、その内部あるいは本体に立ち入ることはできなかった。

このように、慢性関節リウマチに関連する遺伝子については、その実体はもとより、染色体上の遺伝子座位すら全く捉えられていないのが実状であった。

一方、多型性マーカーを用いた連鎖解析法およびポジショナルクローニング法は、近年、遺伝性疾患の研究に革命的進歩をもたらした。これらの方法を用いることによって、従来は手がかりさえなかった疾患遺伝子の染色体局在が明らかにされただけではなく、多数の疾患について原因遺伝子が単離、解析されている(実験医学、vol. 12 No. 6: 80-85, 1994)。また最近では、多型性マーカーとしてマイクロサテライトマーカー(Nature, 359:794-801, 1992; Nature Genet., 7:246-339)を用いた連鎖解析と、古典的遺伝学の手法である患者家系の解析を組み合わせた同胞対解析法によって、I型糖尿病の原因遺伝子が単離され(Nature, 171: 130-136, 1994)、自己免疫疾患をはじめとする難病についても原因遺伝子の特定が可能であることが示唆されている。

この出願は、以上のとおりの事情と最新の研究動向を踏まえてなされたものであり、ヒト染色体上にその存在位置を新たに特定した慢性関節リウマチの疾患遺伝子、並びにこれらの遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法を提供することを目的としている。

発明の開示

この出願は、上記の課題を解決する発明として、以下の各遺伝子を提供する。

(1) ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および/またはD1S253がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの

疾患遺伝子。

(3) ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

また、この出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

さらにこの出願は、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの原因因子の決定方法を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第1～第5染色体地図である。

第2図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第6～第15染色体地図である。

第3図は、この発明の遺伝子座位の特定に用いたマイクロサテライトマーカーの第16～第22染色体地図および性染色体地図である。

第4図は、PCR産物のゲル電気泳動の一例である。

第5図は、PCR産物のジェノタイプによる解析の一例である。

第6図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体

1～6にプロットした結果である。

第7図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体7～12にプロットした結果である。

第8図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体13～18にプロットした結果である。

第9図は、解析したマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体19～Xにプロットした結果である。

第10図は、この発明の疾患遺伝子を指示するマーカー部位を含めた複数のマーカー部位について、第1染色体(上段)、第8染色体(中段)およびX染色体(下段)ごとに、各マイクロサテライトマーカーのMLS値とターゲット遺伝子との遺伝的距離(単位:センチモルガン)の関係を示したグラフ図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、この発明の遺伝子について、その特定方法を詳しく説明する。

この発明の遺伝子は、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を慢性リウマチ患者およびその血縁者に対して実施することにより染色体座位を特定した複数の遺伝子である。すなわち、この発明者は、ヒト染色体の全長にわたってマイクロサテライトマーカー遺伝子のDNA上の多型性(CAの繰り返し配列による長さの多型)を利用して、慢性関節リウマチの疾患感受性に関係する全遺伝子座位を決定した。具体的な方法は以下のとおりである。

(1)ゲノムDNAの抽出

米国リウマチ学会の診断基準に合致し、関節破壊の程度がステージ2以上である慢性関節リウマチ患者(A)、別のリウマチ患者(B)とその健常同胞(C)を一組とし、合計35組を対象として解析した。各人から、EDTAを用いて抹消血(10ml)を採血し、これを20mlのバッファーI[0.32M sucrose, 5%v/v Triton X-100, 5mM MgCl₂, 12mM Tris HCl(pH 7.6)]とゆるやかに混合し

て細胞膜を溶解した。遠心分離したのち、沈殿した核をバッファーⅡ [4M guanidine thiocyanate, 12mM EDTA, 375mM NaCl, 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.1M β -mercaptoethanol, 12mM Tris HCl(pH 7.6)]と反応させて核膜を溶解し、次いでエタノール沈殿によりDNAを抽出した。

(2) マイクロサテライトDNAのPCR増幅とサイジング

抽出したゲノムDNAを鋳型として、第1図から第3図に示した染色体座位に対応するマイクロサテライトマーカー遺伝子を蛍光標識プライマー(パーキンエルマー社製)を用いてPCR増幅した。なお、マーカーD1S502はDNA増幅が技術的に困難なため使用しなかった。また、HLA-D領域を詳しく分析するため、D6D276の代わりにD6S299、D6S265、D6S273の各遺伝子を増幅した。また、以上のマイクロサテライトDNAの増幅に加え、HLA-D RB1領域近傍の遺伝子についても制限酵素断片長多型(RFLP)マーカーを用いてPCR増幅し、合計359マーカー部位に対して検索を行った。

なお、マイクロサテライトDNAの増幅におけるPCR反応溶液(15 μ l)の組成はDNA(30ng); プライマー混合物(0.2 μ M); dNTP(各 0.2mM); DNAポリメラーゼ(1 unit); MgCl₂(2.5mM); 1x PCRバッファーⅡであり、増幅反応の条件は、94℃で10分間、変性(94℃、30秒間); アニーリング(55℃、1分間); 伸長(72℃、2分間)を27サイクル、最後に72℃で5分間とした。

6-FAM、TETまたはHEXで標識した各PCR産物は、TAMURA標識されたサイズスタンダードと共に、1パネルのゲル(4% acrylamide/6M urea)上にて、DNAシーケンサー(ABI 377; アプライドバイオシステム社製)内で電気泳動した。第4図はこの電気泳動の一例であるが、この方法では画像としてパターン認識されたサイズスタンダードを参照してDNA断片のピーク、大きさ、領域を解析するため、電気泳動による誤差を極力低くすることができる。その後、コンピューターに取り込まれた蛍光画像の位置からそれぞれのマ

一カー遺伝子のサイジングを行い、家系毎に親由来の遺伝子がどのように伝播したかを決定した。さらに、電気泳動の結果はジーンスキンの解析を経て、ジェノタイパー解析ソフトでサイジングされた。第5図はこのジェノタイパーによる解析結果の一例である。

(3)連鎖解析

マイクロサテライトマーカーによる連鎖解析を用いた同胞対解析法は、I型糖尿病の原因遺伝子の同定において既に公知であるが(Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 8560-8565, 1995)、慢性関節リウマチを対象とする場合にはこの方法をそのまま使用することはできない。何故ならば、通常の同胞対解析法は患者とその両親との間で同祖遺伝子(IBM: identical by descent)の遺伝様式を決定するが、老年性疾患である慢性関節リウマチの場合、患者はその発症時に既に両親が死亡していることがほとんどであり、IBM値を一義的に決定することが不可能だからである。

そこで、この発明ではIBM値を求めるに当たって、患者(A)、患者(B)、健常同胞(C)の3名の組み合わせを1組とし、35組について解析を行った。すなわち、IBM値とは本来親が保有する遺伝子aが両罹患同胞に分与された場合に1となり、罹患同胞がそれぞれの対立遺伝子を共有し、しかもその各々が親の片方から分与された場合には $IBM=2$ となる。両親が既に死亡して親の遺伝子がタイピングできない時は、IBMは一義的に決定することはできない。ところが、解析の対象とする人種集団における任意の遺伝子マーカーの分布が決まっていれば、この遺伝子のアロタイプ頻度を用いてIBM値を決定することができる。つまり、患者(A)、患者(B)、健常同胞(C)の3名の間の見かけ上のIBMの一致を、

(A-B間のIBM値、A-C間のIBM値、B-C間のIBM値)

とし、任意の遺伝子に着目してこれをaとし、その他を \hat{a} としたとき、あり得る可能性は表1に示したとおりの27通りとなる。

表 1

- Case 1: (aa, aa, aa), (aā, aā, aā), (āā, āā, āā)
 Case 2: (aa, aa, āā), (āā, āā, aa)
 Case 3: (aa, āā, aa), (āā, aa, aa), (aa, āā, āā), (āā, aa, āā)
 Case 4: (aa, aa, aā), (aā, aā, aa), (aā, aā, āā), (āā, āā, aā)
 Case 5: (aa, aā, aa), (aā, aa, aa), (aa, aā, āā), (aā, aa, āā), (aā, āā, aā),
 (āā, aā, āā), (aā, āā, āā), (āā, aā, āā)
 Case 6: (aa, āā, aā), (āā, aa, aā)
 Case 7: (aa, aā, āā), (aā, aa, āā), (aā, āā, aa), (āā, aā, aa)

このとき、遺伝子aのアロタイプ頻度を P_a として、Holmans & Clayton (Am. J. Hum. Genet. 57: 1221-1232, 1995)の式1によってLod値(L値)が求められる。

$$\text{式 1: } L = \sum_{P \in P} \Pr \left(\begin{array}{c} \text{parental} \\ \text{genotypes } P \end{array} \right) \left[\prod_{j=1}^{N_H} \Pr(g_i | P) \right] \times \sum_{j=0}^2 \Pr \left(\begin{array}{c} \text{genotypes of} \\ \text{affected pair} \end{array} \middle| \begin{array}{c} \text{IBD}, \\ P \end{array} \right) z_j$$

例えば、表1のCase 1の3通りのL値をそれぞれ L_{11} 、 L_{12} 、 L_{13} として算出すると、これらの値は、各々、式2、式3および式4で求められる。

$$\text{式 2: } L_{11} = P_a^4 z_0 + 1/2 P_a^3 (1+P_a) z_1 + 1/4 P_a^2 (1+P_a)^2 z_2$$

$$\text{式 3: } L_{12} = P_a^4 z_0 + 1/2 P_a^3 (1+P_a) z_1 + 1/4 P_a^2 (1+P_a)^2 z_2$$

$$\text{式 4: } L_{13} = 3P_a^2 P_a^2 z_0 + 1/2 P_a P_a (1+2P_a P_a) z_1 + P_a P_a (1+1/2 P_a P_a) z_2$$

同様にして、 L_{11} から L_{72} までのL値が算出される。さらに全被験者について同様の計算することによって、母集団における遺伝子aのL値が式5によって求められる。

$$\text{式 5: } L = \frac{n!}{m_1! m_2! \dots m_n!} L_n^{m_1} L_n^{m_2} \dots L_n^{m_n}$$

次いで、このL値は、変数 Z_0, Z_1, Z_2 を $Z_0 \leq 1/2, Z_0 \leq 1/2 Z_1, Z_0 + Z_1 + Z_2 = 1$ の条件下で全ての範囲を変動させて最大L値(L_{\max})を求める。一方、マーカーと実際の遺伝子の関連がなかった場合のL値(L_{null})は、 $Z_0 = 0.25, Z_1 = 0.50, Z_2 = 0.25$ で固定し、次の式6で得られる。

$$\text{式6: } L_{\text{null}} = \frac{n!}{n_0! n_1! \dots n_r!} L_0^{n_0} L_1^{n_1} \dots L_r^{n_r}$$

最終的に、最大Lod値(Maximal Load Score: MLS)が式7として求められる。

$$\text{式7: } \text{MLS} = \log \frac{L_{\max}}{L_{\text{null}}}$$

第6図から第9図は、解析した全359個のマイクロサテライトマーカーについてのMLS値を染色体毎にプロットした結果である。ここで、一つには、MLS値が3.0前後を示したマーカー部位を原因遺伝子とも対応関係が有意であると見なすことができる。すなわち、MLS値は、マーカーと原因遺伝子の対応関係が偶然に起こりうる場合と比較した確率であり、対数値 \log_{10} で表されているから、 $\text{MLS} = 3.0$ の場合には、偶然に対応関係が生じるよりも1000倍高い確率で対応関係が存在すると見なすことができる。すなわち、マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556およびDXS1232はMLS値が3.0前後と極めて高く、原因遺伝子の極めて近い位置を指示することが分かる。

また、第10図は、上記4つのマーカー部位を含めた複数のマーカー部位について、第1染色体(上段)、第8染色体(中段)およびX染色体(下段)ごとに、各マイクロサテライトマーカーのMLS値と疾患遺伝子との遺伝的距離(単位: センチモルガン)の関係を示したグラフ図である。この第10図に示したように、ヒト第1染色体については、マイクロサテライトマーカーD1S214および/ま

たはD1S253のマーク部位の極めて近い位置にターゲットとなる慢性関節リウマチの疾患遺伝子が存在することが分かる。同様に、ヒト第8染色体においては、マイクロサテライトマーカーD8S556のマーク部位、X染色体においては、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232のマーク部位の極めて近い位置に疾患遺伝子が存在することが分かる。

この発明の慢性関節リウマチ疾患遺伝子は、以上のとおりの特定の染色体座位に存在する遺伝子(上記したマイクロサテライトマーカーの8マーク部位±1センチモルガン以内の少なくとも1カ所以上に存在する遺伝子)であり、例えば、ポジショナルクローニング等の公知の方法によってそのコード領域を特定し、さらには塩基配列を決定することによって、有効な治療法の確立に大きく貢献することができる。また、この発明によって用いられたマイクロサテライト遺伝子のPCR増幅とその解析は、慢性関節リウマチの診断および原因因子の決定にも応用することができる。すなわち、罹患の可能性のある被験者のゲノムDNAを、上記の染色体座位に対応するマーカーをプライマーとしてPCR増幅し、第5図に示したようなジェノタイパーによる解析により健常者のそれと対比することによって、以後の発症を高い精度で判定することができる。

産業上の利用可能性

この発明によって、ヒト慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、これらの疾患遺伝子の変異を指標とする慢性関節リウマチの診断方法および原因因子の決定方法が提供される。これらの発明は、医薬品開発および医療技術の開発等に利用可能である。

請求の範囲

1. ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および／またはD1S253がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

2. ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

3. ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

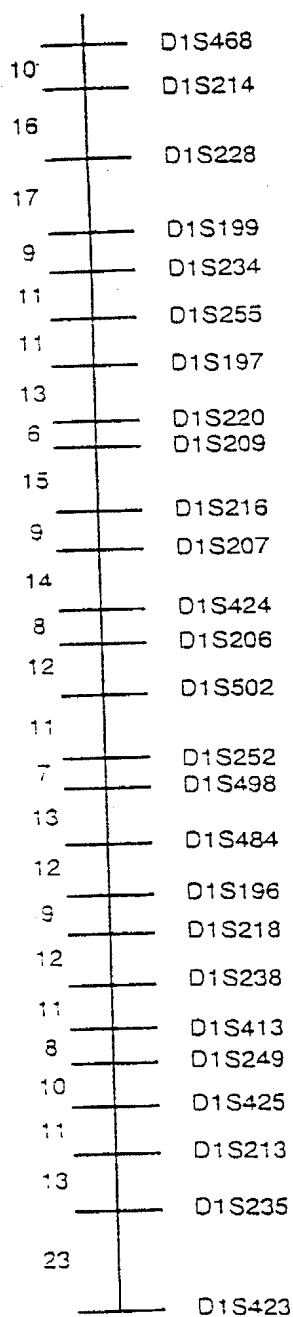
4. マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。

5. マイクロサテライトマーカーD1S214、D1S253、D8S556、DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227およびDXS1232の少なくとも1つをプライマーとして被験者のゲノムDNAをPCR増幅し、これらのPCR産物を対象健常者の同一PCR産物と比較することを特徴とする慢性関節リウマチの原因因子の決定方法。

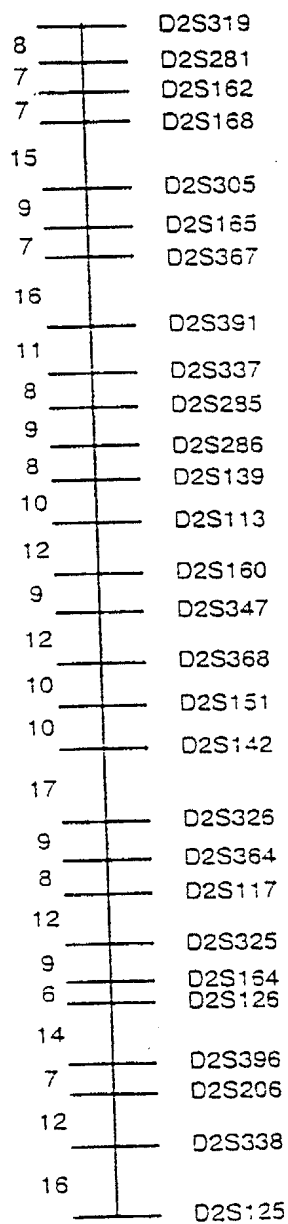
1/10

第1図

Chromosome 1



Chromosome 2

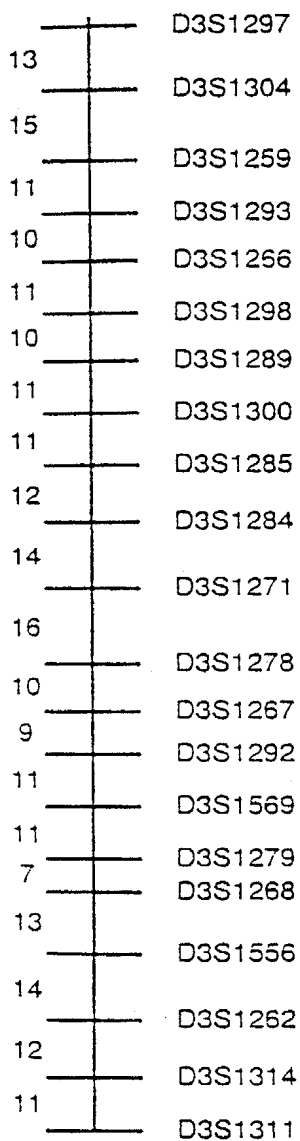


差替え用紙 (規則26)

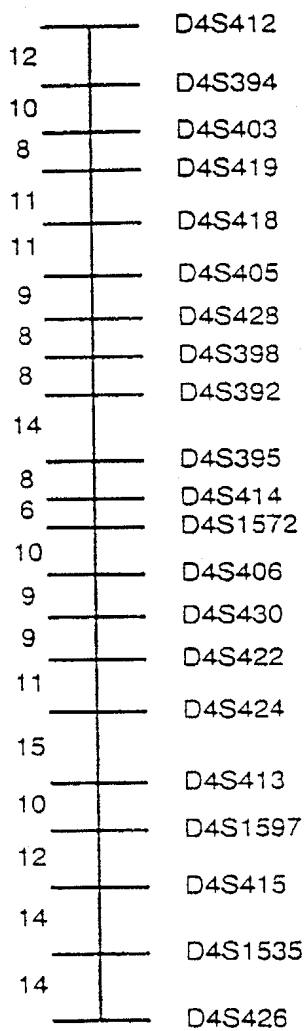
1 / 1 / 10

第1図の続き

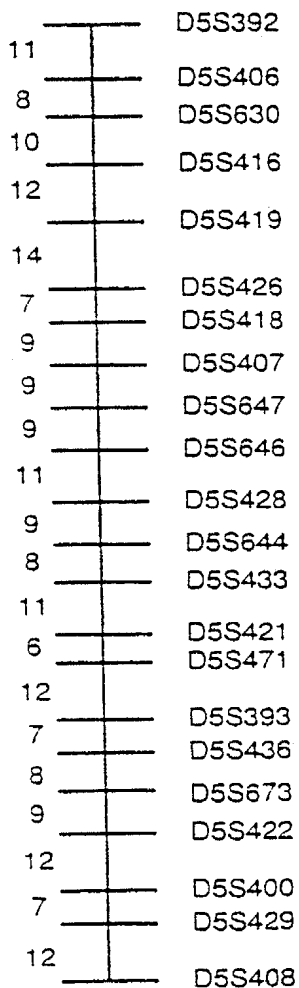
Chromosome 3



Chromosome 4

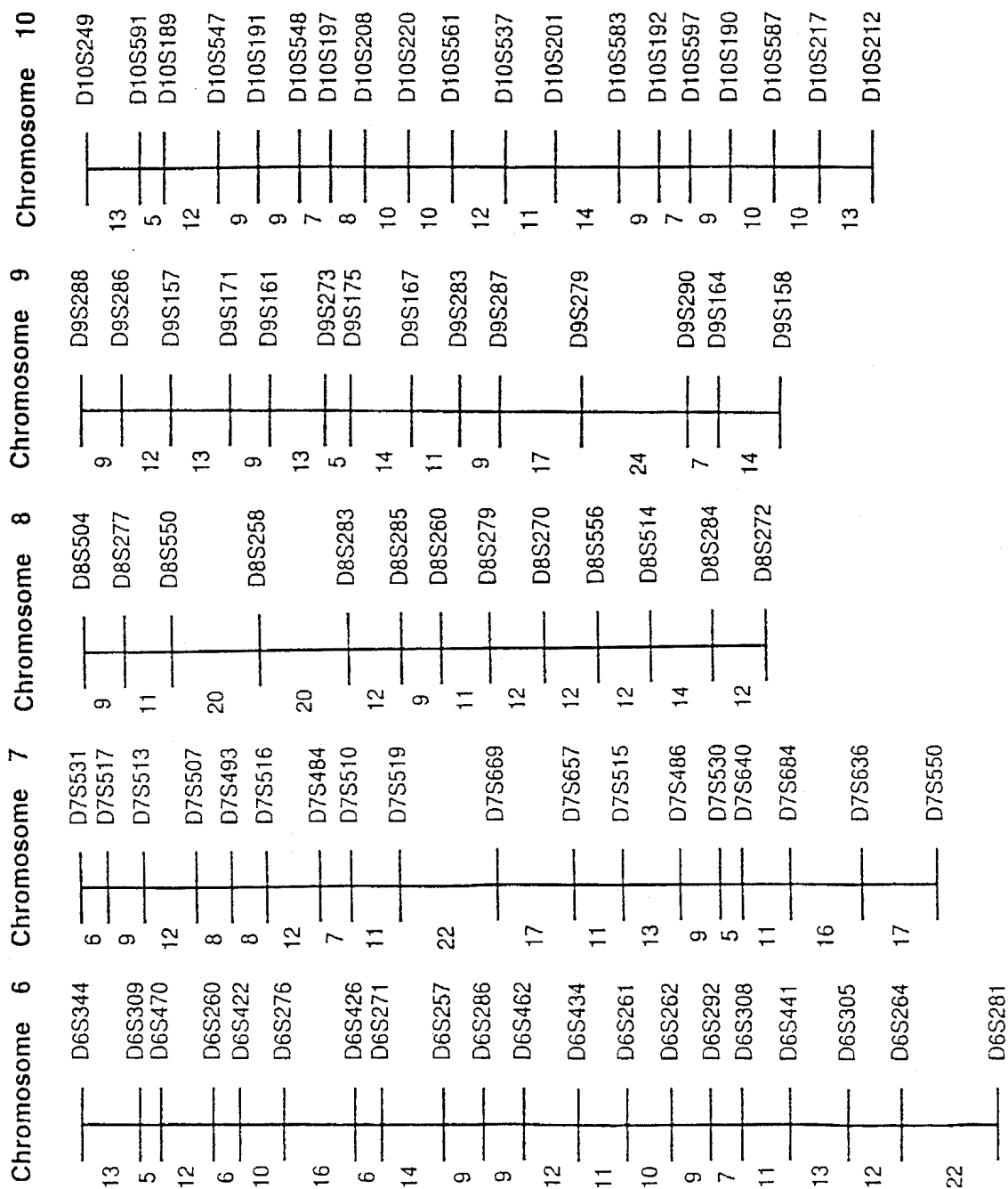


Chromosome 5



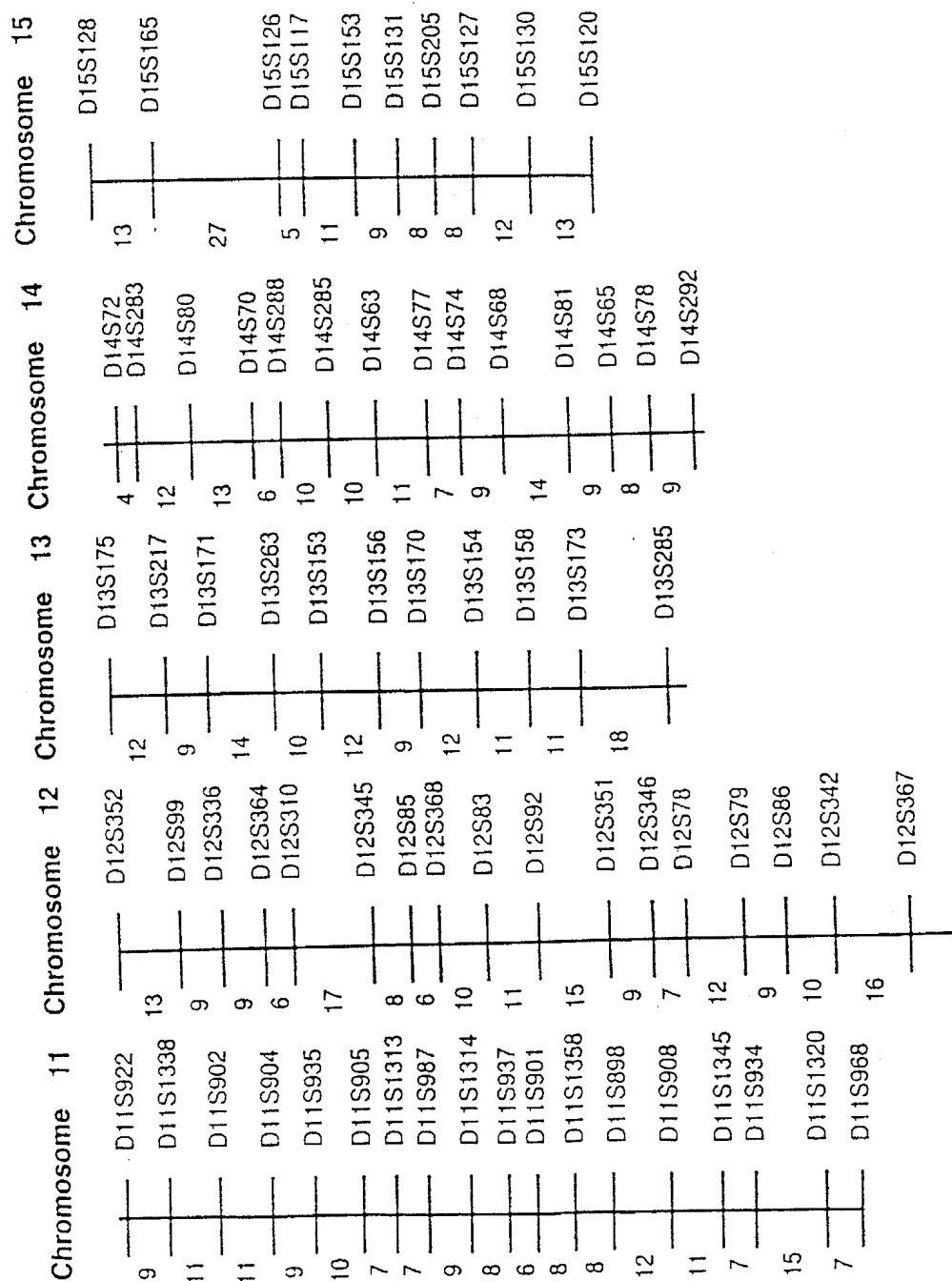
2/10

第2図



差替え用紙 (規則26)

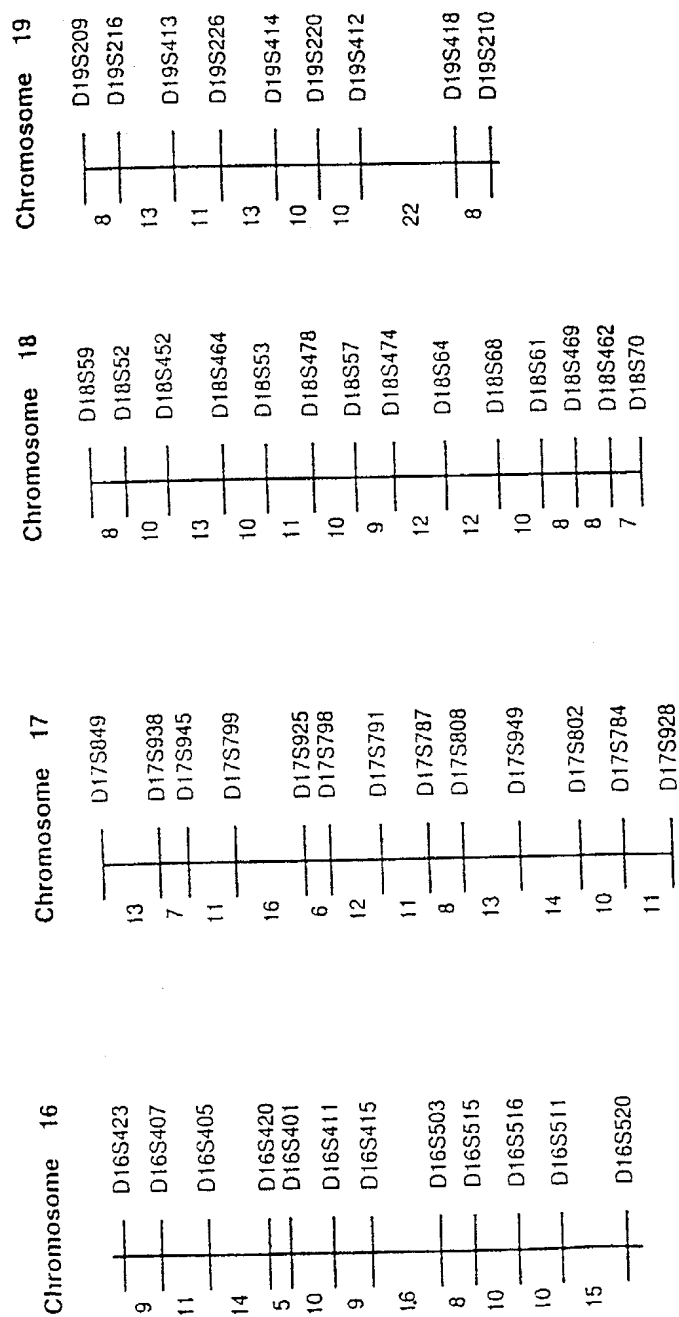
2/1/10
第2図の続き



差替え用紙 (規則26)

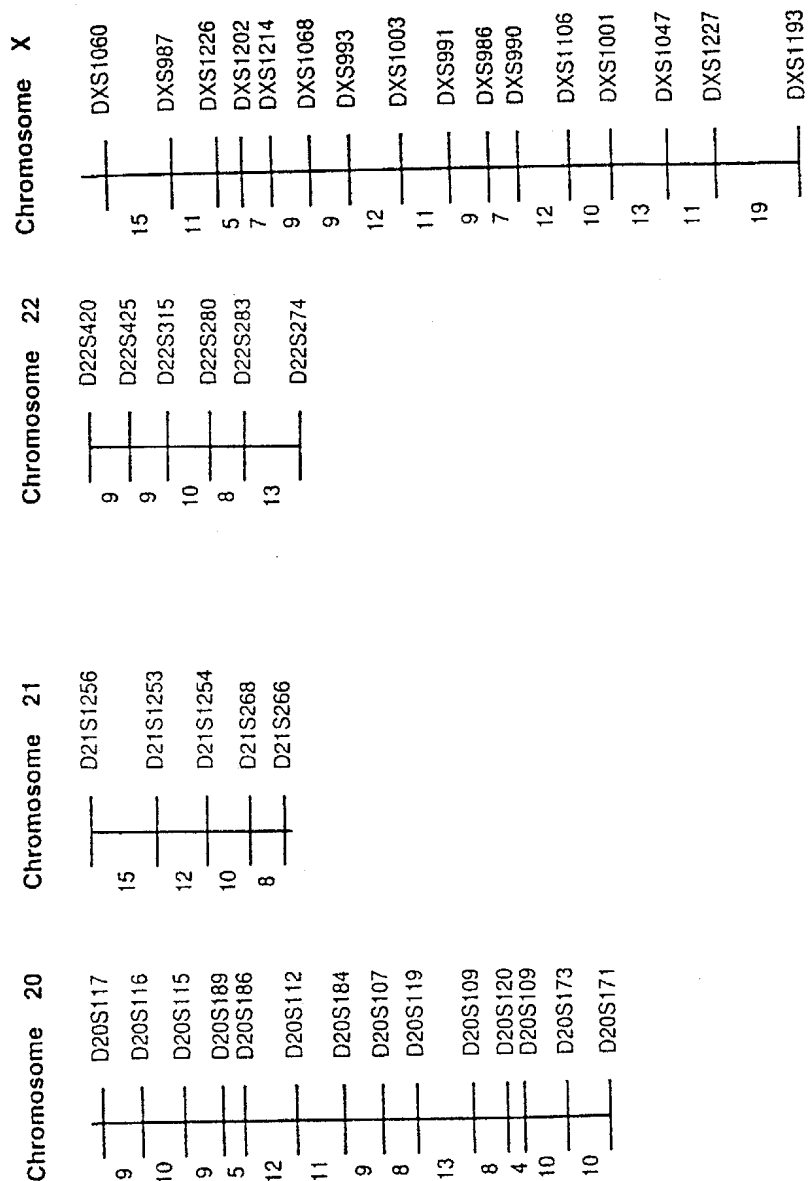
3/10

第3図



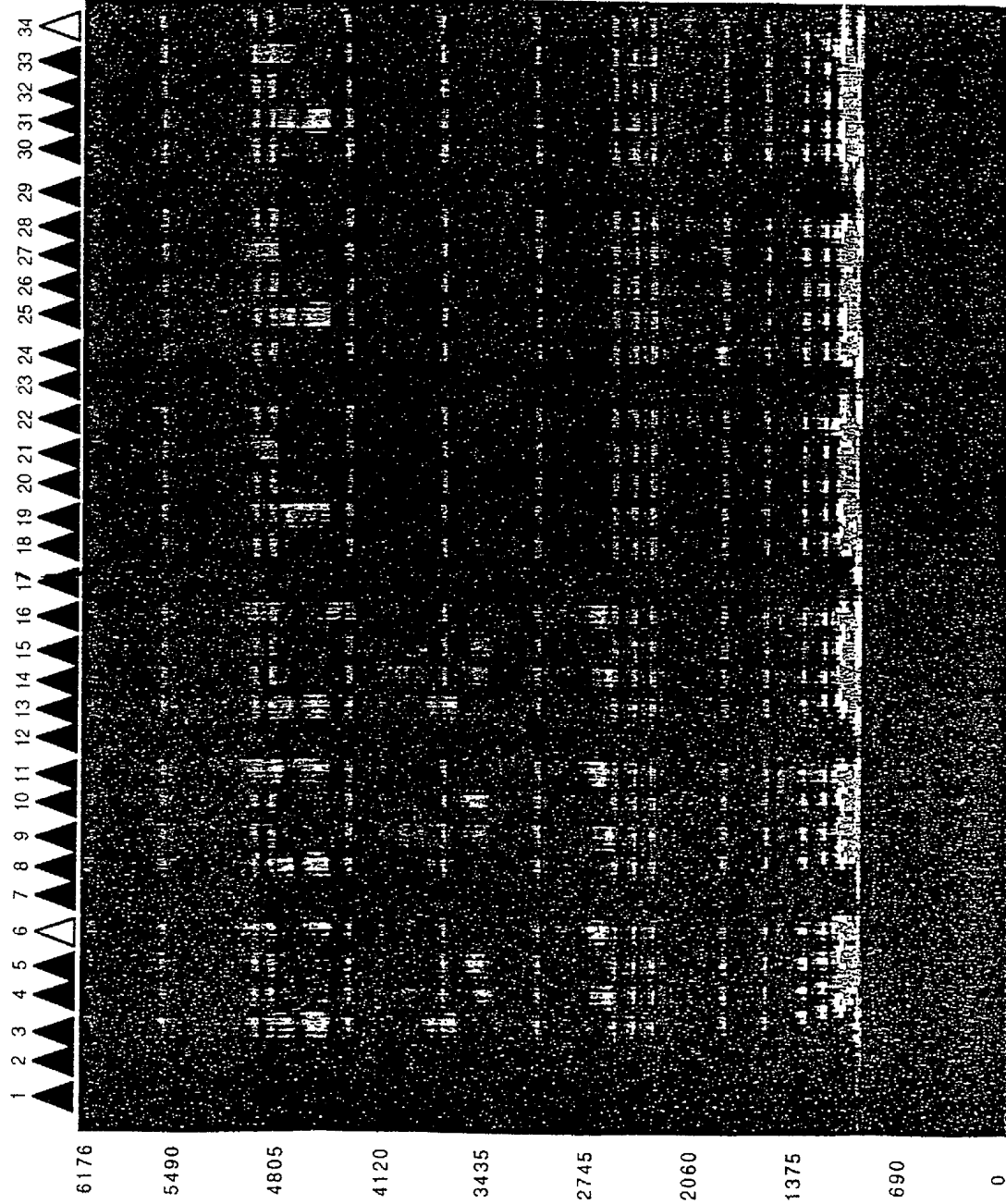
差替え用紙 (規則26)

3 / 1 / 1 0
第3図の続き



違替え用紙 (規則26)

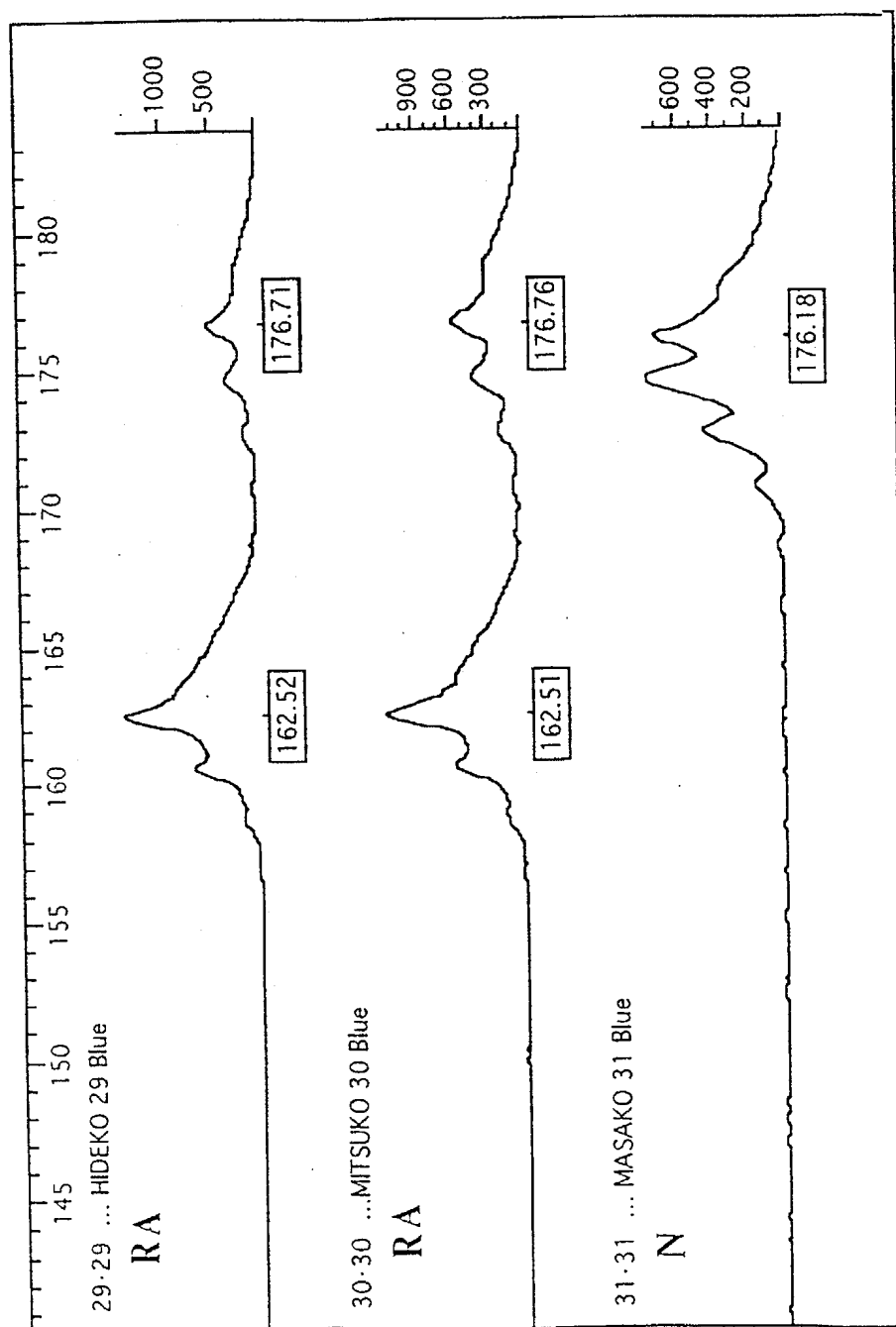
4/10
第4図



差替え用紙 (規則26)

5/10

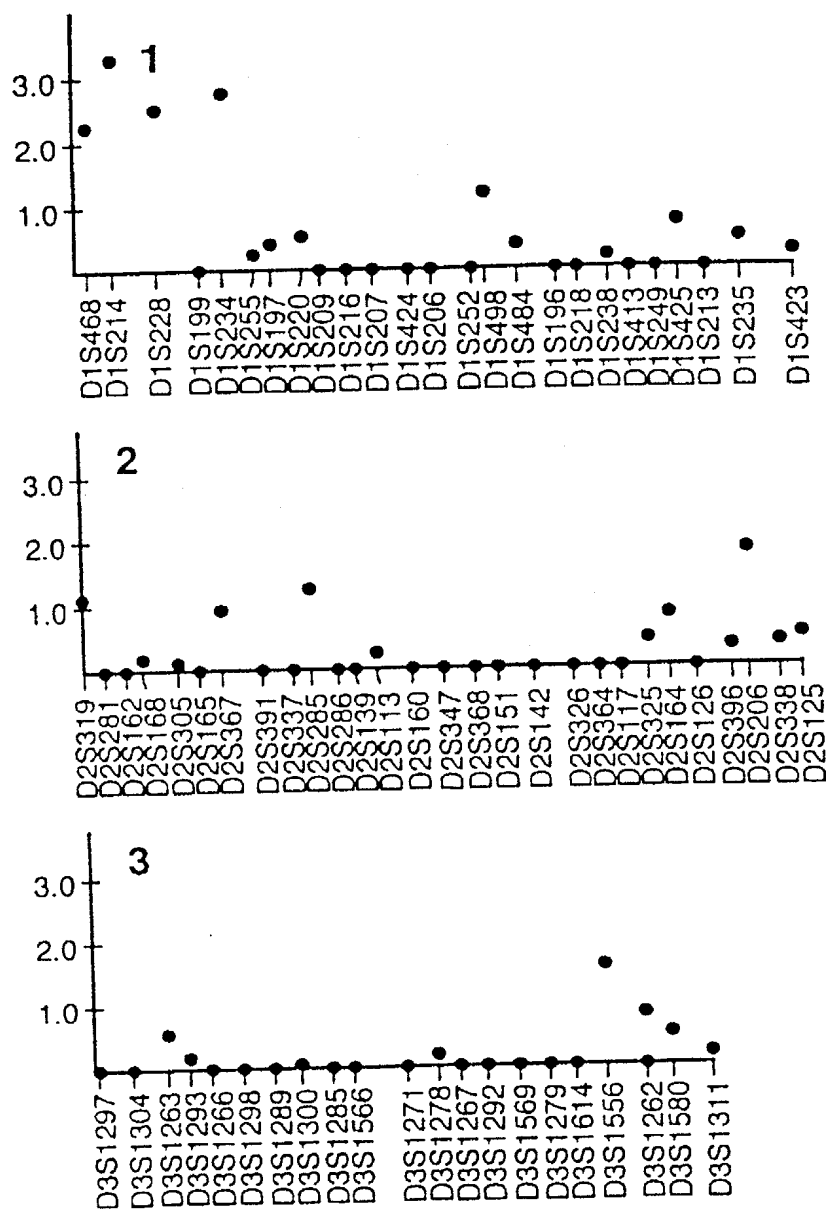
第5図



差替え用紙 (規則26)

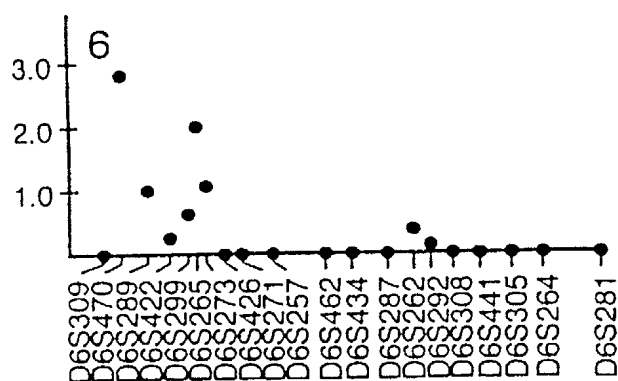
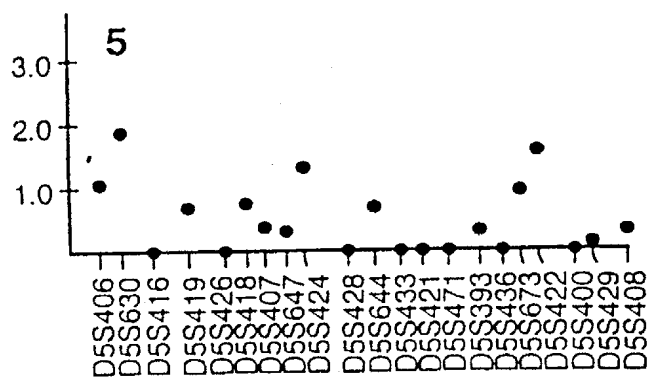
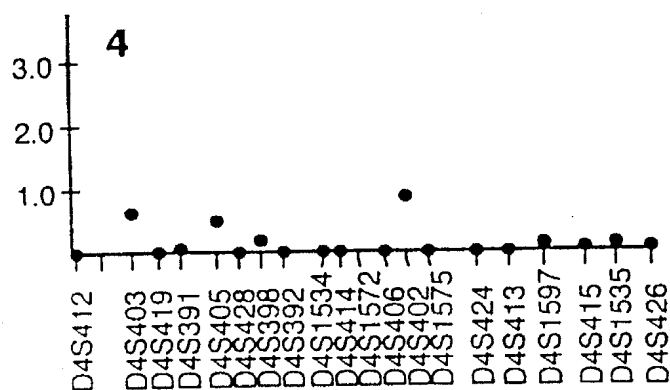
6/10

第6図



差替え用紙 (規則26)

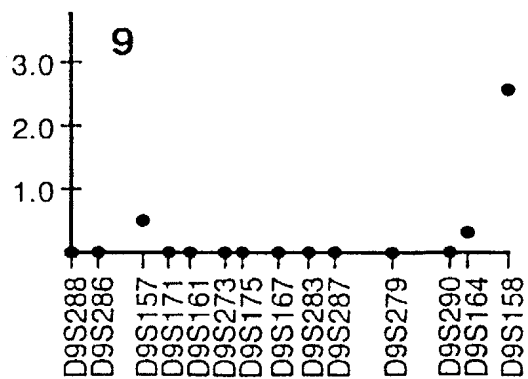
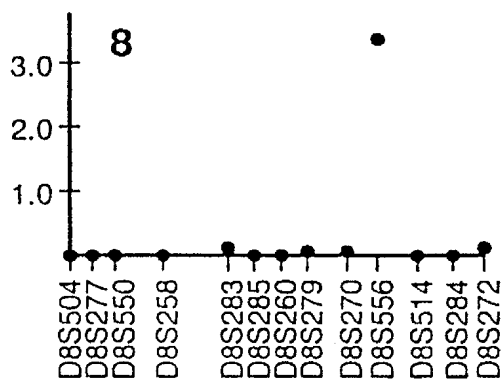
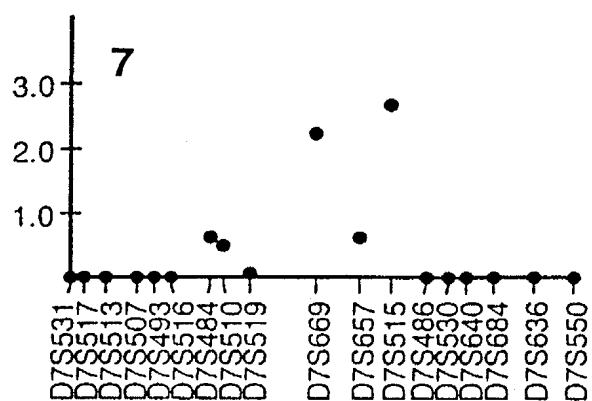
6/1/10
第6図の続き



遮替え用紙 (規則26)

7/10

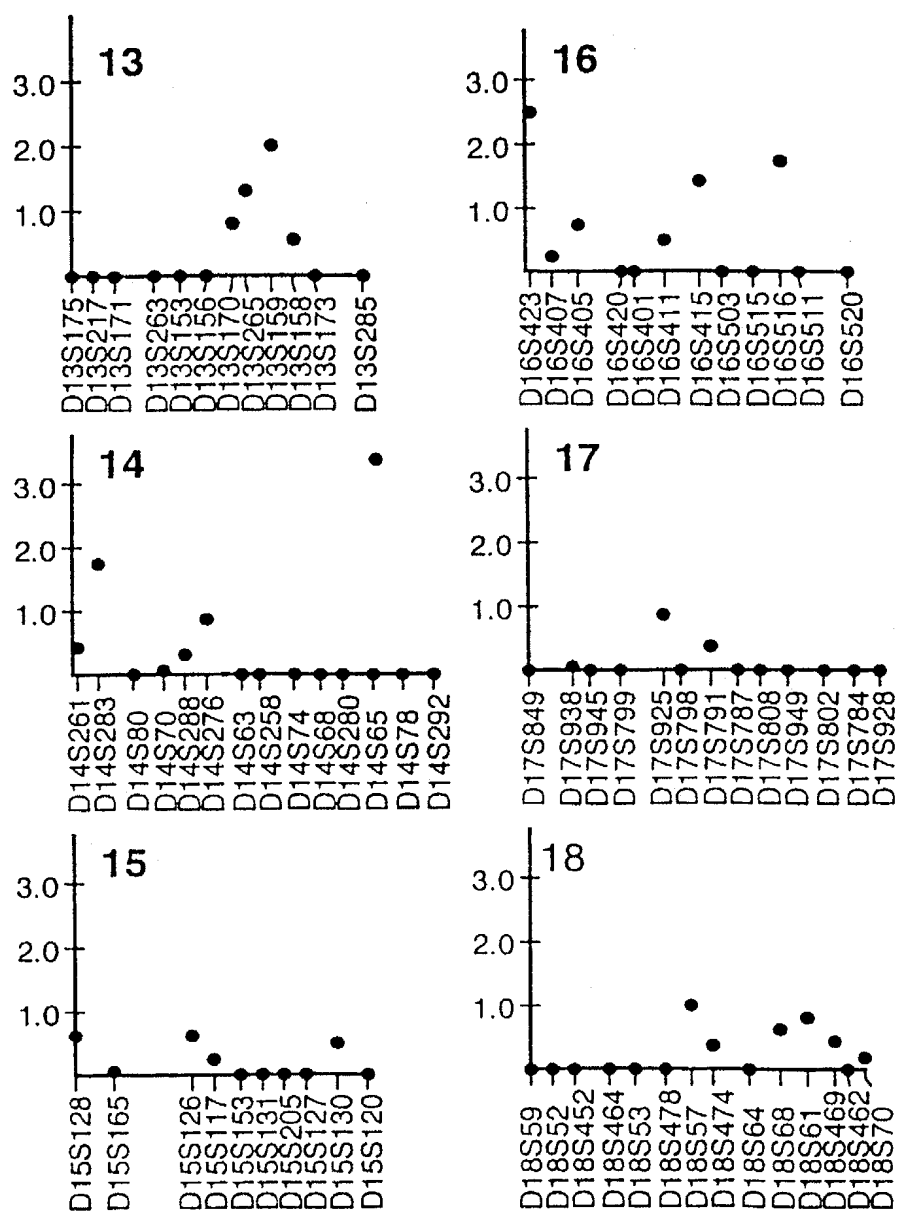
第7図



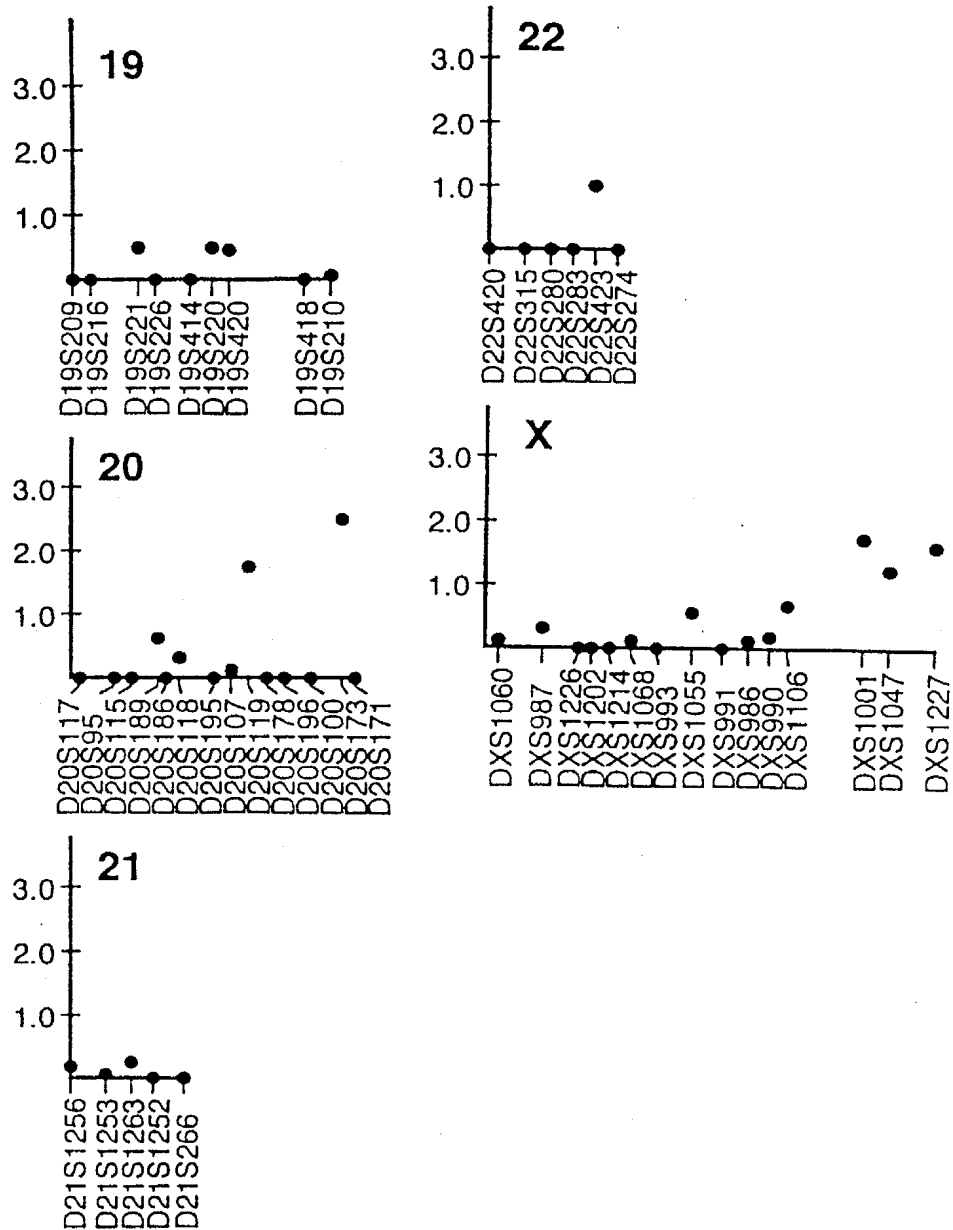
差替え用紙 (規則26)

8 / 10

第8図

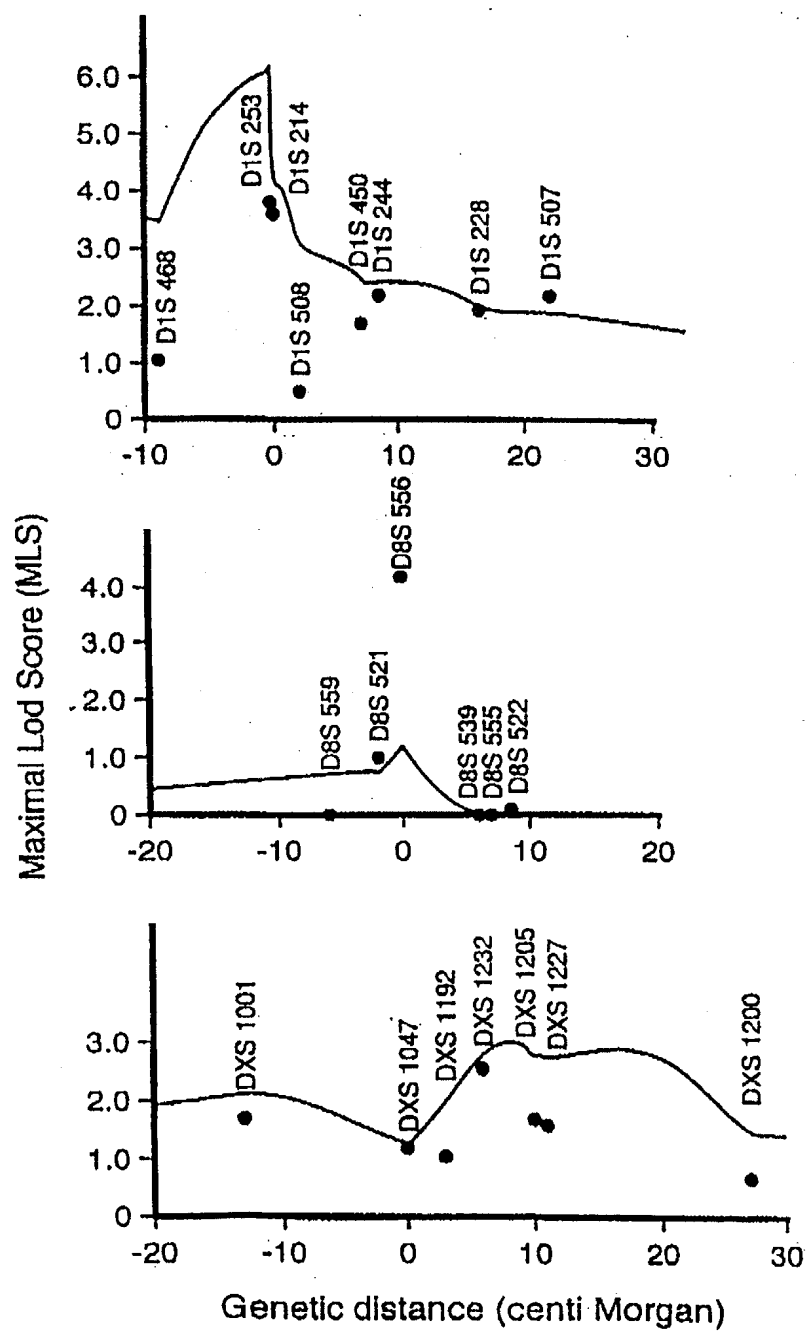


9/10
第9図



10/10

第10図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/11, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/11, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nature Genetics Vol. 14 No. 1 (1996) Wilder R L et al., "A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats" p.82-85	1-3, 5
A	Cell Vol. 85 (1996) Timothy J. Vyse et al., "Genetic Analysis of Autoimmune Disease" p.311-318	1-3, 5
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92 (1995) John A. Todd "Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches" p.8560-8565	1-3, 5
A	Am. J. Hum. Genet. Vol. 57 (1995) Peter Holmans et al., "Efficiency of Typing Unaffected Relatives in an Affected-Sib-Pair Linkage Study with Single-Locus and Multiple Tightly Linked Markers" p.1221-1232	1-3, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
August 7, 1998 (07. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01665

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NATURE Vol. 359 (1992) Jean Weissenbach et al., "A second-generation linkage map of the human genome" p.794-801	1-3, 5
A	Akio Nishimura, "The Japanese Journal of Clinical Medicine", Vol. 50, No. 3 (1992), Nihon Rinshosha, pages 11 to 15	1-3, 5

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/01665

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C12N15/11, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nature Genetics Vol.14 No.1 (1996) Wilder R L et al. 「A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats」 p.82-85	1-3, 5
A	Cell Vol.85 (1996) Timothy J.Vyse et al. 「Genetic Analysis of Autoimmune Disease」 p.311-318	1-3, 5
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92 (1995) John A. Todd 「Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches」 p.8560-8565	1-3, 5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
07.08.98	18.08.98	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	
日本国特許庁 (ISA/JP)	光本 美奈子	
郵便番号100-8915	4B 9359	
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Am. J. Hum. Genet. Vol. 57 (1995) Peter Holmans et al. 「Efficiency of Typing Unaffected Relatives in an Affected- Sib-Pair Linkage Study with Single-Locus and Multiple Tightly Linked Markers」 p. 1221-1232	1-3, 5
A	NATURE Vol. 359 (1992) Jean Weissenbach et al. 「A second-generation linkage map of the human genome」 p. 794-801	1-3, 5
A	西村昭緒 「日本臨牀」 第50巻 第3号 (1992) 日本臨牀社 第11-15頁	1-3, 5

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 24 October 2000 (24.10.00)	
International application No. PCT/JP00/01697	Applicant's or agent's file reference 00-F-007PCT
International filing date (day/month/year) 21 March 2000 (21.03.00)	Priority date (day/month/year) 20 March 1999 (20.03.99)
Applicant SHIOZAWA, Shunichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

05 October 2000 (05.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Henrik Nyberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/56888</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01697</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月21日(21.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/116933 1999年3月20日(20.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 塩澤俊一(SHIOZAWA, Shunichi)[JP/JP] 〒651-2274 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人(米国についてのみ) 駒井浩一郎(KOMAI, Koichiro)[JP/JP] 〒665-0802 兵庫県宝塚市花屋敷荘園1-12-8 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: RHEUMATOID ARTHRITIS GENE AND METHOD FOR DIAGNOSING RHEUMATOID ARTHRITIS</p> <p>(54)発明の名称 慢性関節リウマチの疾患遺伝子と慢性関節リウマチの診断方法</p> <p>(57) Abstract A rheumatoid arthritis gene occurring in human X chromosome which is a variant sequence of a proto-oncogene Dbl gene transcribing an mRNA encoding a cDNA the sequence of the bases at the 2679- to 2952-positions of which is represented by SEQ ID NO:1, characterized by transcribing an mRNA encoding a cDNA wherein the region of the bases from the 19- to 274-positions of SEQ ID NO:1 has been substituted by the sequence represented by SEQ ID NO:2; and a method for diagnosing rheumatoid arthritis characterized by detecting the occurrence of mRNA of the above-described gene or its expression product in a biological sample.</p>		

(57)要約

ヒトX染色体に存在する慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、慢性関節リウマチの診断方法として、配列番号1にその第2679番目塩基から第2952番目塩基までの配列を示したcDNAをコードしているmRNAを転写するプロトオンコジーンDbl遺伝子の変異配列であって、配列番号1の第19番目塩基から第274番目塩基までの領域が配列番号2の配列に置換されているcDNAをコードしているmRNAを転写することを特徴とする慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、生体試料中におけるこの疾患遺伝子のmRNAまたはその発現産物の存在を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
		JD	ヨルダン	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ

明 細 書

慢性関節リウマチの疾患遺伝子と
慢性関節リウマチの診断方法

5

技術分野

この出願の発明は、ヒトX染色体に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子と、この疾患遺伝子またはその発現産物の存在を検出することを特徴とする慢性関節リウマチ

10 の診断方法に関するものである。

背景技術

慢性関節リウマチの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、この慢性関節リウマチの属する自己免疫疾患の多くは多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・増悪するため、疾患の正しい解明と適切な治療を行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかに

15 されなければならない。

慢性関節リウマチは、世界的には罹患率1%以下の疾患であるが(N. Engl. J. Med. 322:1277-1289, 1990)、患者の同胞では約8%以上が発症する(Cell, 85:311-318, 1996)ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。しかしながら、疾患の遺伝的因子を特

20 定するため通常用いられている分子遺伝学的手法や遺伝子工学的手法は、自己免疫疾患に対しては有効に機能してい

ない。何故ならば、自己免疫疾患は、癌のように突然変異を生じた１個の遺伝子の異常増殖という生物学的に単純な機構によって発症するものではないからである。また、疾患の遺伝的基盤を求める従来の古典的遺伝学の手法は、自己免疫疾患が多因子遺伝によることを明確にしたものの、その内部あるいは本体に立ち入ることはできなかった。このように、慢性関節リウマチに関連する遺伝子については、その実体はもとより、染色体上の遺伝子座位すら全く捉えられていないのが実状であった。

これに対して、この出願の発明者等は、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を慢性リウマチ患者およびその血縁者に対して実施することにより、慢性関節リウマチの疾患遺伝子が位置する３カ所の遺伝子座を特定し（*International Immunology* 10(12):1891-1895, 1998; *Journal of Clinical Rheumatology* 4(3):156-158, 1998）、以下の疾患遺伝子を既に特許出願している（PCT/JP 98/01665号）。

(1) ヒト第１染色体の、マイクロサテライトマーカー D1S214 および／または D1S253 がハイブリダイズする DNA 配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第８染色体の、マイクロサテライトマーカー D8S556 がハイブリダイズする DNA 配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(3) ヒト X 染色体の、マイクロサテライトマーカー D

X S 1 0 0 1、D X S 1 0 4 7、D X S 1 2 0 5、D X S 1 2 2 7 および／または D X S 1 2 3 2 がハイブリダイズする D N A 配列から ±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

- 5 この出願の発明者等は、前記先願発明の各疾患遺伝子についてさらに研究を続けた結果、前記(3)の疾患遺伝子についてその具体的遺伝子を特定し、その分子構造を決定した。

10 発明の開示

- この出願は、前記の課題を解決する発明として、配列番号 1 にその第 2679 番目塩基から第 2952 番目塩基までの配列を示した c D N A をコードしている m R N A を転写するプロトオンコジーン D b l 遺伝子の変異配列であって、配列番号 1 の第 20 番目塩基から第 274 番目塩基までの領域が配列番号 2 の配列に置換されている c D N A をコードしている m R N A を転写することを特徴とする慢性関節リウマチの疾患遺伝子を提供する。

- またこの出願は、前記疾患遺伝子の c D N A、この c D N A の一部配列からなる D N A 断片、前記疾患遺伝子が発現するタンパク質、このタンパク質の一部からなるペプチド、および前記タンパク質に対する抗体を提供する。

- さらにこの出願は、生体試料中における前記疾患遺伝子の m R N A または前記タンパク質の存在を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

この出願は、またさらに、D b l 欠損を機能的に補完する

方法を提供する。

発明を実施するための最良の形態

- 上記のとおりの特徴を有するこの出願の発明について、
- 5 以下にその実施の形態を説明する。
- この発明の慢性関節リウマチ疾患遺伝子（以下「RA疾患遺伝子」と記載する）は、後記する実施例の方法によりヒトX染色体から単離された遺伝子であり、公知のプロト
- 10 オンコジーンDbl遺伝子（EMBO J. 7(8):2465-2473, 1988; GenBank Accession No. X12556）の変異配列である。すなわち、このDbl遺伝子は、配列番号1に第2679番目塩基から第2952番目塩基までの配列を示したcDNAをコードしているmRNAを転写するが、この変異遺伝子のcDNA
- 15 においては、配列番号1の第241番目塩基から3'側の配列が第18番目塩基下流に結合してアミノ酸翻訳のフレームシフトを誘起した結果、配列番号1の第19番目塩基から第274番目塩基までの領域が配列番号2の配列に置換されている。図1は、健常者（Normal）におけるDbl遺伝子cDNAの第2679番目塩基から第2952番目塩基までの塩基配列
- 20 （配列番号1と同一）と、これに対応するRA疾患遺伝子の塩基配列、並びにこれらの塩基配列がそれぞれコードするアミノ酸残基（1文字表記）の配列である。
- なお、一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号2において、1または複数のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチ
- 25 ドによる置換がなされているcDNAをコードする遺伝子

もこの発明の R A 疾患遺伝子に含まれる。同様に、これらの塩基の変更によって生じる 1 または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされているタンパク質もこの発明に含まれる。

- 5 この発明の c D N A は、例えば、後記する実施例の方法に従って単離することができる。また、この発明の c D N A は、例えば慢性関節リウマチ患者の細胞から抽出したポリ(A)+ R N A を鋳型として、公知の方法(Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982 ; J. Gene 25:263-269, 1983 ; Gene 10 150:243-250, 1994) により作成した c D N A ライブラリーからクローン化することができる。クローン化の方法としては、例えば、この発明によって提供される配列情報に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはプラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。
- 15 また、目的とする c D N A 断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、慢性リウマチ患者の細胞から単離した m R N A から R T - P C R 法により、この発明の c D N A を調製する
- 20 こともできる。

この発明の D N A 断片は、前記 c D N A の一部配列であって、配列番号 3 の塩基配列を含む D N A 断片である。すなわち、この配列番号 3 は図 1 に下線を付した配列であり、健常者 D b l 遺伝子やその c D N A には存在しない特徴的な領域である。なお、この D N A 断片にはセンス鎖およびアンチセンス鎖が含まれる。これらの D N A 断片は遺伝子診

25

断用のプローブ等として用いることができる。

この発明のタンパク質は、この発明のRA疾患遺伝子の発現産物であって、そのC末端アミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であるタンパク質である。このタンパク質は、この出願によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいはこの出願によって提供されるcDNAを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってタンパク質を取得する場合には、この発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことにより、タンパク質を得ることができる。またcDNAの翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換え、この組換えベクターで大腸菌、枯草菌、酵母、動植物細胞等を形質転換すれば、これらの形質転換体でタンパク質を大量に発現させることができる。

この発明のタンパク質をインビトロ翻訳で生産させる場合には、この発明のcDNAの翻訳領域をRNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに組換え、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すればよい。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

また、この発明のタンパク質を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明
5 のcDNAの翻訳領域を組換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すればよい。その際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンを付加すれば、任意の領域を含むタンパク質断片を得ることができる。あるいは、
10 他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。この融合タンパク質を適当なプロテアーゼで切断することによって目的とするタンパク質のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現シ
15 ステムなどが例示できる。

この発明のタンパク質を真核細胞で発現させる場合には、この発明のcDNAの翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入する。発現ベクター
20 としては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、
25 分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、これらに限定されるものではない。

発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

上記の方法により原核細胞や真核細胞でタンパク質を発
5 現させたのち、培養物から目的タンパク質を単離精製する
ためには、公知の分離操作を組み合わせて行う。例えば、
尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、
酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、
ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交
10 換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィ
ニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー
等である。

なお、この発明のタンパク質には、他の任意のタンパク
質との融合蛋白質も含まれる。

15 この発明のペプチドは、少なくとも配列番号2のアミノ
酸配列における一部配列（5アミノ酸残基以上）を含むペ
プチド断片である。このペプチドは抗体を作製するための
抗原等として用いることができる。

この発明の抗体は、前記タンパク質それ自体、またはそ
20 の部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクロー
ナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

この発明の慢性関節リウマチ診断方法は、例えば、被験
者の生体試料（体液、細胞等）におけるRA疾患遺伝子から
25 転写される特徴的なmRNAの存在を検出することによ
って行うことができる。そのようなmRNAの検出は、例

えば、その特徴的配列部分（例えば、図１の下線配列）を含む mRNA を RT-PCR 増幅する方法、RA 疾患遺伝子 mRNA の特徴的配列部分をプローブとした *in vitro* ハイブリダイゼーション分析や *in situ* ハイブリダイゼーション分析等により行うことができる。

さらにこの発明の慢性関節リウマチ診断方法は、被験者の生体試料における RA 疾患遺伝子から発現されるタンパク質の存在を検出することによって行うことができる。このような検出は、例えば、この発明の抗体を用いた酵素免疫アッセイや放射免疫アッセイ等により行うことができる。また、このような遺伝子発現またはタンパク質の検出は、診断キット（例えば、DNA チップ等のハイブリダイゼーション分析キットあるいは ELISA キット等の免疫アッセイキット）により行うこともできる。

この発明の Dbl 欠損を補完的方法としては、タンパク質や低分子化合物を使用する等の方法が挙げられる。

実施例

以下、実施例を示してこの発明の RA 疾患遺伝子についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

<実施例 1> RA 疾患遺伝子の同定

遺伝解析をマイクロサテライトマーカを用いた罹患同胞対検索法によって行うためにリウマチ患者家系 DNA を患者 2、健常者 1 を 1 家系としてグアニジンチオシアネート法（日本輸血学会雑誌 40(2), 413）により末梢血から調

製した。さらに多型性 (heterozygosity) が約 0.7 を越えるマイクロサテライトマーカを、発明者等が既に明らかにした候補遺伝子座 (International Immunology 10(12):1891-1895; Journal of Clinical Rheumatology 4(3):156-158, 1998) の範囲内について 11 マーカー (DXS1047, DXS8072, DXS8041, DXS8094, DXS1192, DXS1205, DXS1227, DXS8106, DXS8043, DXS8028, DXS1200) を選択 (Nature 360, 1996) し、それぞれの部位を増幅できる蛍光標識プライマーをPerkin Elmer社にて合成した。プライマー配列は前記文献に記載されており公知である。各マーカー領域の単離は下記の条件のPCR反応により行った。反応液組成はプライマー 5pmol、鋳型 DNA 約 0.5 μ g、Buffer II (Perkin Elmer社) 1.5 μ l、2mM の dNTP Mix (Perkin Elmer社) を 1.0 μ l、AmpliTaQ Gold 酵素 (Perkin Elmer社) 0.12 μ l、25mM の MgCl₂ (Perkin Elmer社) を 0.9 μ l 混合し、滅菌水で全量を 15 μ l に調整した。反応はMJ Research社製サーマルサイクラー (PTC200型) を用い、まず酵素活性化行程として 95°C 12分 1 サイクル、熱変性 94°C 1 分、プライマーアニーリング 47°C 1 分、伸長反応 72°C 2 分の行程を 10 サイクル繰り返した後、熱変性 89°C 1 分、プライマーアニーリング 47°C 1 分、伸長反応 72°C 2 分の行程を 20 サイクル繰り返した。得られた各 DNA 断片はそれぞれ試薬添付書に従って Genescan 用サイズマーカー (Perkin Elmer社) と同時に泳動することで DNA シーケンサー (Perkin Elmer社製 ABI377型) にて分析を行い、付属ソフトウェア Genescan および Genotyper を用いて鎖長解析を行った。得

られたデータは一般公開されているMapmaker Sibbsソフトウェア (Am J Hum Genet, 57, 439-454, 1995) を用いてUnixシステム上で遺伝連鎖解析を行い、最大Lod値を単点解析法によって計算した。

- 5 その結果、発明者等が既に明らかにした候補遺伝子座 (International Immunology 10(12):1891-1895; Journal of Clinical Rheumatology 4(3):156-158, 1998) の一つであるDXS1232の0.1cM近傍に位置するDXS984において最大Lod値は2.03を示し、有意な相関が得られた。これをインターネット上国際データベース (Genemap98, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>) で検索したところG3 Radiation hybrid map上でDXS984の物理的位置が4259 cR10000 (F) であることが判明し、最も近傍にプロトオンコジーンDbl遺伝子が位置していること
- 10 が明らかとなった。

<実施例2> Dbl遺伝子異常の解析

- Dbl遺伝子のcDNAを比較するために、RA患者末梢血からIsogen試薬 (Nippongene社) を用いて調製したトータルRNAからPerkin Elmer社製RT-PCRキットを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成して20 μ lの滅菌水に溶解した。さらにDbl cDNA配列 (Genbank Accession No. X12556) を元にプライマー (配列番号4、5) を合成し (Amersham Pharmacia社)、PCR法によってDbl cDNA配列の一部を単離した。PCRの反応液組成はフ
- 20 ォワードプライマー (配列番号4) およびリバースプライマー (配列番号5) 各10pmol、鋳型DNA約0.1 μ g、LA-PCR
- 25

Buffer (宝酒造社) $2.5\mu\text{l}$ 、 2.5mM の dNTP Mix を $4.0\mu\text{l}$ 、LA Taq 酵素 (宝酒造社) $0.25\mu\text{l}$ 、 25mM の MgCl_2 を $2.5\mu\text{l}$ 混合し、滅菌水で全量を $25\mu\text{l}$ に調整した。反応は MJ Research 社製 サーマルサイクラー (PTC200型) を用い、熱変性 94°C 30秒、プライマーアニーリング 52°C 30秒、伸長反応 72°C 2分の行程を 35 サイクル 繰り返した。得られた PCR 産物は 1% Agarose L (Nippongene 社) ゲルと Promega 社製 DNA 分子量マーカー (200bp ladder) を用いて TAE 緩衝液中で常法によって電気泳動し、増幅バンドを確認した。その結果、正常鎖長の DNA が 660-bp であるのに対し、一部患者由来の DNA は異常短鎖長 (約 440bp) であることを見出した。

次いで、それぞれの得られたバンドを切り出した後 65°C 10 分の行程でゲルを融解し、常法のフェノール抽出法およびエタノール沈殿法により DNA を精製した。得られた DNA は 100ng を鋳型として Perkin Elmer 社製 BigDye terminator サイクルシーケンスキットを用いて添付書に従ってサイクルシーケンス反応および精製を行い、Perkin Elmer 社製 ABI377 型 DNA シーケンサーによって配列解析を行った。その結果、前記の異常短鎖長 DNA においては、図 1 に示したように、塩基番号 2697 番目から 2919 番目までの 223-bp が欠損しているために 437-bp となっていることが明らかとなった。これは塩基番号 2698 番目以降の遺伝情報でコードされているアミノ酸欠損を伴い、併せてフレームシフトを誘起することによって通常よりも 65 アミノ酸短い異常ポリペプチド鎖が生じていることを意味する。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願によって、ヒト X 染色体に存在する慢性関節リウマチの疾患遺伝子が提供される。これによって、慢性関節リウマチの診断を簡便かつ確実に行うことが可能となる。また、慢性関節リウマチの新たな治療法および治療薬剤の開発にも有用である。

請求の範囲

1. 配列番号 1 にその第 2679 番目塩基から第 2952 番目塩基までの配列を示した cDNA をコードしている mRNA を転写するプロトオンコジーン Dbl 遺伝子の変異配列であ
5 っ、配列番号 1 の第 19 番目塩基から第 274 番目塩基までの領域が配列番号 2 の塩基配列に置換されている cDNA をコードしている mRNA を転写することを特徴とする慢性関節リウマチの疾患遺伝子。
- 10 2. 請求項 1 の疾患遺伝子の cDNA。
3. 請求項 1 の疾患遺伝子または請求項 2 の cDNA の一部であって、配列番号 3 の塩基配列を含む DNA 断片。
4. 請求項 1 の疾患遺伝子の発現産物であって、C 末端のアミノ酸配列が配列番号 2 のアミノ酸配列であるタンパク質。
15
5. 請求項 4 のタンパク質の一部であって、配列番号 2 のアミノ酸配列における一部配列を含むペプチド。
6. 請求項 4 のタンパク質または請求項 5 のペプチドに対する抗体。
- 20 7. 生体試料中における請求項 1 の疾患遺伝子の mRNA または請求項 4 のタンパク質の存在を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。
8. Dbl 欠損を機能的に補完する方法。

2680 2690 2700 2710 2720 2730
 Normal; tcttcagcagaatgatgaaaaagcaacaggagcgttttataagtaactgaggaaactgaattg
 RA ; tcttcagcagaatgatgaaagaccctgtgtcggagatggctctctatatattgatgaagctact
 L Q Q N D E K Q Q G A F I S T E E T E L
 L Q Q N D E D L C R R W L S Y I D E A T

 2740 2750 2760 2770 2780 2790
 gaacacaccagcactgtgtggaggctctgtgaggcaattgcgtcagttcagggcagaagca
 atgtcaaatggcaagtag
 E H T S T V V E V C E A I A S V Q A E A
 M S N G K *

 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860
 aatacagtttggaactgaggcatcacaaatctgtagaatctctgaagaacctgcgggaatggt
 N T V W T E A S Q S V E I S E E P A E W

 2870 2880 2890 2900 2910
 caagcaactatttctaccccacttatgatgaaaaatgaagaagaaaaataggccccctcatg
 S S N Y F Y P T Y D E N E E E N R P L M

 2920 2930 2940 2950
 agacctgtgtcggagatggctctctctatatattga
 R P V S E M A L L Y *